
学位論文

歯の移動時におけるケモカインの発現に関する検討

塩屋園 敦

キーワード：歯周組織，歯の移動，リモデリング，ケモカイン，破骨細胞

The Expression of Chemokine in the Periodontal Tissue during Tooth Movement

Atsushi SHIOYASONO

Abstract : Chemokines are a group of cytokines that form a large family of structurally related proteins and are chemotactically active for specific types of leukocytes. Recently, various biological effects of chemokine such as angiogenesis, immune response and cancer metastasis were reported, in addition to chemotactic activity for leukocytes. The objective of this study was to analyze the expression of chemokines in the periodontal tissue remodeling during experimental tooth movement. Tooth movement was performed by the elastic band insertion between the upper first and second molars of 7 weeks-old male Sprague-Dawley rats according to the method of Waldo. The animals were sacrificed at 12 hours, 1, 2, 3, 4 and 7 days after the placement of elastic bands. The rats without elastic bands were used as controls. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis using specific primers for chemokines and its receptors revealed that the expression of Macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1 α) and its receptors (CCR1, CCR5), and that of Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) and its receptor CXCR4 were increased in the periodontal tissue during tooth movement. In addition, immunohistochemical staining was carried out using paraffin embedded sections to examine the localization of these chemokines and receptors. MIP-1 α expression was observed in the pressure side of periodontal ligament (PDL) fibroblast at 1 and 2 days after orthodontic force application. On the other hand, CCR5 expression was observed in PDL fibroblast and osteoblast, and a high level of expression could be observed at 3 days. SDF-1 was expressed by PDL fibroblast and osteoblast, and a maximum expression could be found at 3 days. CXCR4 positive cells were detected in the bone marrow of alveolar bone, and the number of these cells were increased corresponding to tooth movement. Furthermore, to analyze the effect of MIP-1 α toward osteoclast, in vitro experiment was performed by means of rabbit unfractionated bone cell cultures. As a result, MIP-1 α promoted osteoclast formation, activation and chemotactic activity, and Osteoprotegerin (OPG) blocked MIP-1 α -stimulated osteoclast formation and activation. These results suggest that MIP-1 α induces osteoblast RANK ligand expression via CCR5, consequently enhances osteoclastic bone resorption, and that SDF-1 promotes recruitment of CXCR4 positive cells including endothelial progenitor cells and osteoclast precursors. Therefore, these chemokines and receptors may be involved in periodontal tissue remodeling.

緒言

矯正力に伴う歯の移動は、加えられた力学的刺激に応答して歯周組織の改造現象が起きることにより生じると考えられている。矯正力が加わると力の方向に応じて、圧迫側と牽引側が生じ、圧迫側の歯周組織においては破骨細胞の分化、活性化が促進され骨吸収活性が上昇し、一方、牽引側では歯根膜線維芽細胞や骨芽細胞の分化、増殖が促進され、骨形成や歯根膜線維の再配列が始まる。これら一連の歯周組織のリモデリング過程における細胞レベルでの反応に関しては情報伝達物質をはじめとする様々な因子の関与が考えられ、それを明らかにしようとする研究が多く行われてきた。その結果、細胞増殖因子^{1,2)}、サイトカイン³⁾、神経伝達物質⁴⁾、骨基質蛋白⁵⁾、タンパク分解酵素^{6,7)}などの発現上昇が過去に報告されている。ケモカインは主に白血球に対する遊走作用を示す低分子量のサイトカインの一群で、現在までに約50種類が同定されている。アミノ酸配列中に4つのシステイン残基を持つという構造的特徴を有し、N末端側にある2つのシステイン残基の配列パターンによりCC, CXC, C, CX₃Cのサブファミリーに分類されている。一方、ケモカイン受容体はGタンパク共役7回膜貫通型受容体であり、リガンドであるケモカインに対応してそれぞれCCR, CXCR, XCR, CX₃CRに分類され、現在までに約20種類の受容体が同定されている。近年、炎症反応のみならず、免疫応答⁸⁾、血管新生^{9,10)}、腫瘍の転移^{11,12)}などケモカインの多様な機能が明らかにされてきている。また歯科領域では歯髄疾患^{13,14)}や歯周疾患局所¹⁵⁻¹⁹⁾において、細菌刺激により組織からケモカインが産生され、組織破壊につながるリンパ球浸潤に関わっているとする報告が多数ある。また歯の萌出時に歯胚周囲においてケモカインの発現が上昇しているという報告もみられる^{20,21)}。しかし、矯正力に伴う歯周組織のリモデリング過程でのケモカインやその受容体の発現に関する詳細な報告はほとんどなく、その関与については未だ不明な点が多く残されている。そこで本研究ではラットを用いた実験的歯の移動時においてケモカインとその受容体の発現様相を解析し、歯周組織のリモデリングにおけるケモカインの役割について検討を行った。

本論文では、ケモカインの名称を略して使用する。

MIP-1 α : Macrophage inflammatory protein-1 α

MIP-1 β : Macrophage inflammatory protein-1 β

RANTES : Regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted

MCP-1 : Monocyte chemotactic(chemoattractant) protein-1

MCP-3 : Monocyte chemotactic(chemoattractant) protein-3

SDF-1 : Stromal cell-derived factor-1

CINC-1 : Cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1

材料と方法

1. 実験的歯の移動

実験的歯の移動は、Waldo法²²⁾に従い生後7週齢のSprague-Dawley系雄性ラット(日本チャールズブリバー、横浜)の上顎第一臼歯、第二臼歯間に矯正結紮用エラスティック(ELAST RINGS®; GAC International, NY, USA)を挿入することにより行った。(図1)

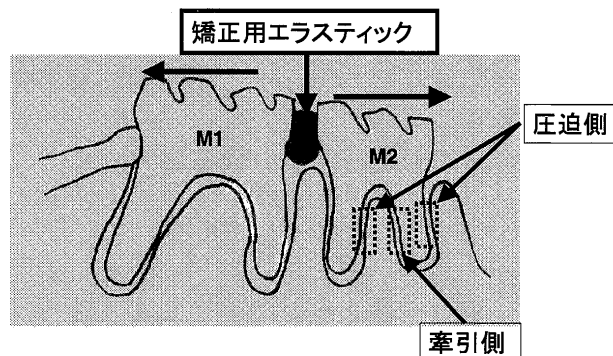


図1 実験的歯の移動方法と観察部位

ラットの上顎第一臼歯と第二臼歯間にエラスティックを挿入して、歯の移動を行った。組織学的観察部位は第二臼歯の歯根膜周囲としエラスティック挿入部位直下は観察部位から除外した。

M1: 上顎第一臼歯, M2: 上顎第二臼歯

2. RNA抽出ならびにRT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) 法

歯の移動開始12時間、1日、2日、3日、4日、7日後、および歯の移動を行っていない対照群のラットから上顎骨を摘出し、液体窒素にて凍結、粉碎した後、RNA抽出用キット(Isogene®; ニッポンジーン、富山)を用い、添付プロトコールに従ってtotal RNAを抽出した。次に目的とする遺伝子の発現レベルの検討は、RT-PCR用キット(RNA PCR Kit®; TaKaRa, 滋賀)を用いて以下の条件で行った。1 μ gのtotal RNAに5 mMのMgCl₂、各1 mMのdNTP Mixture、1 UのRNase inhibitor、0.25 UのAMV Reverse transcriptase、0.125 μ MのOligo dT Primer、2 μ lの10 \times PCR bufferを加え、最終的に全量が20 μ lとなるように蒸留水で調整し、遺伝子増幅装置(iCycler®; Bio-Lad, CA, USA)を用いて42 $^{\circ}$ Cで30分間、99 $^{\circ}$ Cで5分間、逆転写反応させた。得られたcDNAに1 μ Mの各遺伝子の上流および下流の特異的プライマー(表1)、各0.2mMのdNTP Mixture、0.5 UのTaKaRa Taq、2 μ lの10 \times PCR buffer (MgCl₂含有)を加え、最終的に全量が20 μ lとなるように蒸留水で調整し、94 $^{\circ}$ Cで30秒間熱変性、58 $^{\circ}$ ~62 $^{\circ}$ C(表1)で30秒間アニーリング、72 $^{\circ}$ Cで1分間伸長を行う一連の反応を22~28サイクル行った。反応生成物は、エチジウムブロマイド含有1.5%アガロースゲルで電気泳動を行い、UVトラン

表1 プライマーの塩基配列

増幅遺伝子		塩基配列	アニーリング 温度
MIP-1α 679 bp	sense	5'-AGCGAGTACCAGTCCCTTCT-3'	60°C
	antisense	5'-GACTTTGTTCATCACGTCTAC-3'	
RANTES 279 bp	sense	5'-CTGCATCCCTCACCCTCAT-3'	58°C
	antisense	5'-GCTCATCTCCAAATAGTTGAT-3'	
MCP-1 525 bp	sense	5'-CAGGTCTCTGTGCACGCTTCT-3'	58°C
	antisense	5'-AGTATTCATGGAAGGGAATAG-3'	
MCP-3 318 bp	sense	5'-CAGATGCCTGAACAGAAACC-3'	58°C
	antisense	5'-CACTGATTCTTGCAATGTCC-3'	
SDF-1 255 bp	sense	5'-TCCACCTCGGTGTCTCTT-3'	58°C
	antisense	5'-CTTCAGCCGTGCAACAATCT-3'	
CINC-1 222 bp	sense	5'-ACTCCAACAGAGCACCATGG-3'	58°C
	antisense	5'-TTGAGTGTGGCTATGACTTCG-3'	
CCR1 232 bp	sense	5'-GGAGTTCCTCACCATACCTGTAG-3'	58°C
	antisense	5'-GGTCCAGAGGAGGAAGAATAGAAG-3'	
CCR2 233 bp	sense	5'-CGCAGAGTTGACAAGTTGTG-3'	58°C
	antisense	5'-GCCATGGATGAAGTGAAGTA-3'	
CCR5 432 bp	sense	5'-AACCTGGCCATCTCTGACCTG-3'	62°C
	antisense	5'-GTAGCAGATGACCATGAC-3'	
CXCR4 1023 bp	sense	5'-CACTTCGGATAACTACTCC-3'	58°C
	antisense	5'-CTTGAGGATTCTGACTCTG-3'	
GAPDH 288 bp	sense	5'-ACTTTGTGAAGCTCATTTC-3'	60°C
	antisense	5'-TGCAGCGAAGCTTTATTGATG-3'	

スイルミネーター (Benchtop UV Transilluminator®; UVP Inc., CA, USA) 上で写真撮影した。

3. 切片作製

歯の移動開始12時間、1日、2日、3日、4日、7日後、および歯の移動を行っていない対照群のラットに塩酸ケタミン (30 mg/kg; 三共エール薬品, 東京) による麻酔を施し、4%パラホルムアルデヒド (Merck, Darmstadt, Germany) 含有0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.4) にて灌流固定を行った。上顎骨を摘出し、さらに24時間4%パラホルムアルデヒド含有0.1Mリン酸緩衝液で浸漬固定を行った。その後、エタノール系列にて脱水、クロロホルムにて脱脂、再びエタノール系列にて加水した後、19%エチレンジアミン四酢酸ナトリウム溶液 (同仁化学研究所, 熊本) で、4°Cにて3週間脱灰した。脱灰終了後、エタノール系列による脱水後、組織包埋用パラフィン (Paraplast plus®; Kendall, MA, USA) に包埋し、厚さ3 μ mの矢状断薄切切片を作製し、スライドガラス (MAS コート付 Micro slide glass®; 松浪硝子工業, 大阪) 上に貼付した。

4. 免疫組織化学染色

組織切片をキシレンにて脱パラフィン、エタノール系列を用いて加水の後、トリプシン溶液 (1 mg/ml;

Sigma, MO, USA) で37°Cにて30分から60分間抗原賦活化処理を行った。引き続き0.3%過酸化水素水 (Sigma) による内因性ペルオキシダーゼの不活化と5%ウシ血清アルブミン (Sigma) によるブロッキングを行った。一次抗体を4°Cでオーバーナイト反応させ、PBSにて洗浄後、二次抗体としてビオチン標識抗ウサギIgG抗体もしくはビオチン標識抗ヤギIgG抗体 (ニチレイ, 東京) を室温で10分間反応させた。PBSで洗浄後ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (ニチレイ) を室温で5分間反応させ、PBSで洗浄後、ジアミノベンチジン溶液 (シンプルスステイン DAB 溶液®, ニチレイ) で発色させた。なお、一次抗体として抗ラット MIP-1 α ウサギポリクローナル抗体 (Peprotech, London, U.K), 抗ラット CCR1 ウサギポリクローナル抗体 (Santa Cruz, CA, USA), 抗ラット CCR5 ヤギポリクローナル抗体 (Santa Cruz), 抗ラット SDF-1 ヤギポリクローナル抗体 (Santa Cruz), 抗ラット CXCR4 ヤギポリクローナル抗体 (Santa Cruz) を用いた。

5. ウサギ破骨細胞形成系

生後5日齢の日本白色種雄性ウサギ (北山ラベス, 長野) から大腿骨と脛骨を採取し、軟組織を除去後、氷冷した α -minimum essential medium (以下 α -MEM と略す; Sigma) 中で細切し、30mlの α -MEM 中で Vortex mixer にて攪拌して細胞を浮遊させ、メディウムを回収した。引き続き100 \times gで3分間遠心を行い、下部1/3のメディウム (10ml) を回収して破骨細胞に富む分画を分離した。10%ウシ胎児血清 (以下 FBS と略す) を含む α -MEM を用いて 5×10^4 cells/ml の細胞数になるように調整し、ウシ大腿骨から作製した円形骨片上に播種、50ng/ml のヒト可溶性 receptor activator of NF- κ B ligand (以下 RANKL と略す; Peprotech), 10 ng/ml ヒト MIP-1 α (R&D Systems, MN, USA), 1 μ g/ml ヒト osteoprotegerin (以下 OPG と略す; 雪印乳業より供与), を加え37°C, 5% CO₂存在下で4日間培養した。

6. 破骨細胞数および骨吸収活性の測定

培養後、10%ホルムアルデヒド含有 PBS にて細胞を固定し、Leukocyte acid phosphatase kit (Sigma) を用いて酒石酸耐性酸性フォスファターゼ (以下 TRAP と略す) 染色を行い、光学顕微鏡下にて TRAP 陽性かつ3核以上の細胞を破骨細胞として数を計測した。その後、ブラシにて骨片上の細胞を除去し、酸性ヘマトキシリン溶液 (Sigma) にて染色した後、光学顕微鏡下にて吸収窩数を測定した。

7. 破骨細胞遊走活性の測定

前述した方法と同様に、生後5日齢の日本白色種雄性ウサギ (北山ラベス) から大腿骨と脛骨を採取し、軟組織を除去後、氷冷した α -MEM 中で細切し、10 ml の

α -MEM 中で Vortex mixer にて攪拌して細胞を浮遊させた。破骨細胞系の細胞の割合を増すため、50%の FBS、10 mM の HEPES を含む 2 倍量 (20 ml) の α -MEM 上に採取した細胞を含むメディウムを重層し、氷上に10分間静置して細胞を沈降させた。その後、下部 8% のメディウム (2.4ml) を回収し、ポアサイズ 8 μ m のフィルターを用いた Boyden chamber (Neuro Probe, MD, USA) の上部ウェルに 2.5×10^4 cells/50 μ l の細胞を浮遊させ、下部ウェルにそれぞれ 1, 10, 100 ng/ml の MIP-1 α を含有する α -MEM を満たし、37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 存在下で1時間培養した。培養終了後フィルターをメタノールで固定し、TRAP 染色を行い、フィルター上面に存在する細胞を機械的に除去し、フィルター下面に遊走した TRAP 陽性細胞数を計測した。

結 果

1. 歯の移動にともなう組織変化

実験的歯の移動時における経時的な組織変化を明らかにするためにヘマトキシリン-エオジン染色を行い、歯

周組織の変化について検討を行った。歯の移動を行っていないラット (コントロール) の組織では、歯根膜線維の配列は総じて規則的であり、歯槽骨表面に骨芽細胞や破骨細胞がわずかに認められた (図 2 A)。移動開始 1 日後の組織では、移動方向に応じて歯根膜の伸展や圧迫が認められた。また牽引側では骨芽細胞、圧迫側では破骨細胞の増加傾向が認められた (図 2 B)。移動開始 3 日後は組織リモデリングが最も活発となる時期であり、多数の破骨細胞や、骨芽細胞が出現し、骨吸収窩も認められた (図 2 C)。移動開始 7 日後にはリモデリング活性は減少に転じ、骨芽細胞や破骨細胞も徐々に認められなくなった (図 2 D)。以上のように、Waldo 法による実験的歯の移動方法を用いることにより、一連の骨リモデリング過程が観察できることが確認された。

2. 歯の移動にともなうケモカインならびにケモカイン受容体 mRNA 発現の変化

血管新生に関与したり、破骨細胞と共通の起源を持つとされる単球²³⁾を標的細胞とするなど、歯周組織リモ

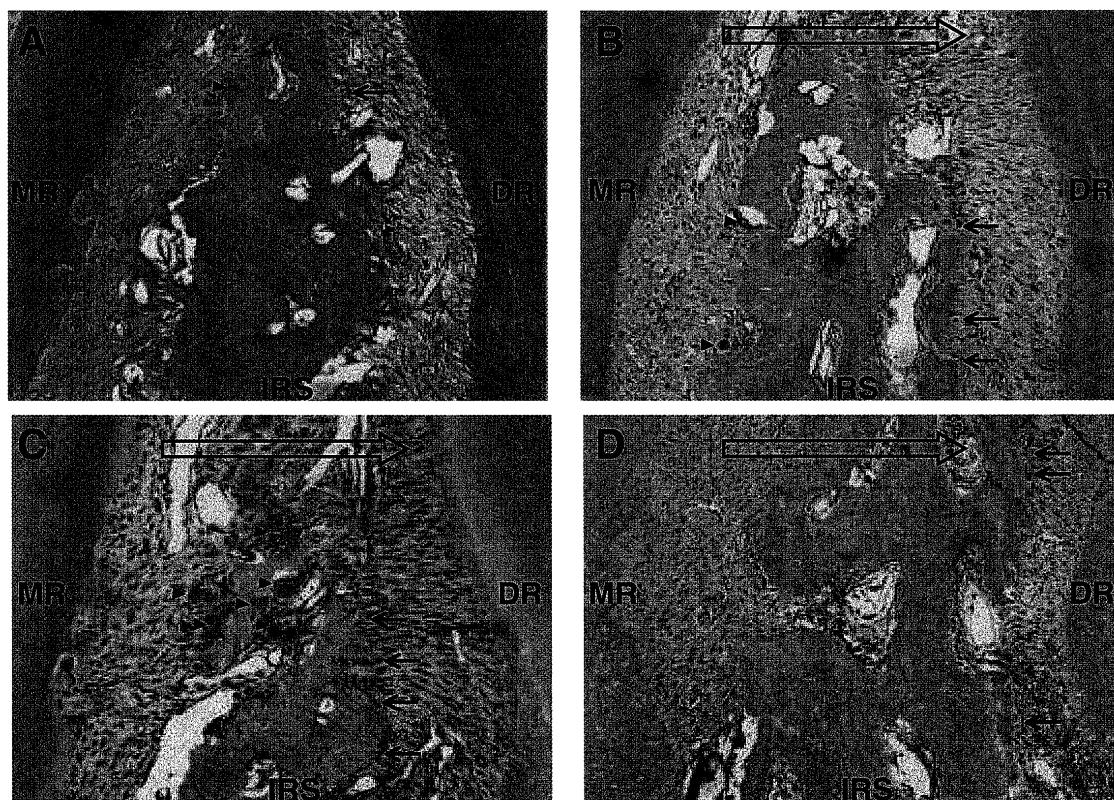


図 2 実験的歯の移動に伴う組織変化

実験的歯の移動時における経時的な組織変化を明らかにするためにヘマトキシリン-エオジン染色を行い、歯周組織の変化について検討を行った。

歯の移動を行っていない対照群 (A)、歯の移動開始 1 日後 (B)、歯の移動開始 3 日後 (C)、歯の移動開始 7 日後 (D) の染色像を示す。

移動開始 3 日後に組織リモデリングが最も活発となり、多数の破骨細胞や、骨芽細胞の出現が認められた。

MR: 上顎第二臼歯近心根, DR: 上顎第二臼歯遠心根, IRS: 上顎第二臼歯根間中隔, 矢頭: 破骨細胞, 矢印: 骨芽細胞, 白抜き矢印: 歯の移動方向

デリングへの関与が考えられるケモカインの中から、代表的なケモカイン（MIP-1 α , RANTES, MCP-1, MCP-3, SDF-1, CINC-1）、およびその受容体（CCR1, CCR2, CCR5, CXCR4）を選び、その mRNA 発現を RT-PCR 法により GAPDH の mRNA 発現のレベルを対照としながら解析した。その結果、MIP-1 α の発現は歯の移動を行っていないコントロールでは認められなかったが、歯の移動に伴い上昇し、移動開始 1 日後に最も強くなった。その後、発現は減少に転じ、移動開始 3 日後には認められなくなった（図 3 A）。MCP-1 は移動開始 1 日後に一過性に発現が認められた（図 3 A）。MCP-3 は歯の移動に伴い発現が上昇し、移動開始 12 時間から 7 日後まで比較的強い発現が持続した（図 3 A）。SDF-1 の発現はコントロールで認められたが、移動開始 12 時間後に一過性に減少し、その後 3～4 日後に再び発現が認められた（図 3 A）。CINC-1 は歯の移動に伴い発現が上昇し、移動開始 12 時間から 7 日後まで弱い発現が持続した（図 3 A）。なお RANTES はいずれの時間においても発現が確認できなかった（図 3 A）。CCR1 の発現は歯の移動に伴い上昇し、移動開始 3 日後に最も強くなったが、その後 7

日後にかけて発現は減少傾向を示した（図 3 B）。CCR 2 は移動開始 12 時間後に一過性に発現が認められた（図 3 B）。CCR5 は歯の移動に伴い上昇し、移動開始 1 日後に最も強くなったが、その後発現は減少に転じ、移動開始 7 日後には認められなくなった（図 3 B）。CXCR4 は移動開始 1 日から 4 日後にかけて発現が持続して認められた（図 3 B）。

3. 歯の移動にともなうケモカインならびにケモカイン受容体の発現局在

RT-PCR 法において、歯の移動に伴い発現に変化が見られたケモカインならびにケモカイン受容体の中から MIP-1 α とその受容体である CCR1 と CCR5、ならびに SDF-1 とその受容体である CXCR4 の局在を免疫組織化学的に検索した。その結果、MIP-1 α は歯の移動開始 1 日後と 2 日後に圧迫側の歯根膜線維芽細胞の一部に陽性染色を認めたが、骨芽細胞や破骨細胞に発現は認められなかった（図 4, 表 2）。また、その受容体である CCR5 は、歯の移動を行っていないコントロールにおいては発現が認められなかったが、歯の移動とともに上昇し、歯根膜線維芽細胞や骨芽細胞にその局在を認めた。移動開始 3 日後に最も強くなり、牽引側において圧迫側より強い発現が認められたが、移動開始 7 日後には発現が減少した（図 5, 表 2）。同様に CCR1 の染色も行ったが発現は確認できなかった（結果非表示）。SDF-1 はコントロールにおいて、生理的な歯の遠心移動に伴い遠心側（圧迫側）の歯根膜線維芽細胞、骨芽細胞、破骨細胞に発現が認められたが、近心側（牽引側）では認められなかった。しかし歯の移動により牽引側でも発現が上昇し、移動開始 3 日後に発現は最も高くなり、歯槽骨骨髓腔周囲の骨芽細胞においてもコントロールと比較して発現の上昇が認められた。その後移動開始 7 日後には圧迫側、牽引側とも発現は減少した（図 6, 表 2）。CXCR4 は、歯根膜線維芽細胞、骨芽細胞、破骨細胞には発現を認めなかったが、根間中隔部骨髓腔内に陽性細胞が認められた。その数は歯の移動に伴い増加傾向を示し、移動開始 3 日後に最大となり、一部は骨髓外においても確認できた。その後移動開始 7 日後には細胞数は減少傾向を示した（図 7, 表 2）。

4. MIP-1 α が破骨細胞に与える影響

ウサギ培養細胞を用いた *in vitro* の実験で MIP-1 α の破骨細胞形成や骨吸収活性に及ぼす影響について検討した。その結果、MIP-1 α の作用により、破骨細胞数や骨吸収窩数は増加し、MIP-1 α が破骨細胞形成ならびに骨吸収能を促進させることが明らかとなった（図 8）。またその効果は、既に破骨細胞の分化を促進させることが知られている可溶性 RANKL の効果を上回るものであったが、RANK-RANKL 結合を競合的に阻害する OPG を作用させると MIP-1 α の効果はコントロールに近いレベ

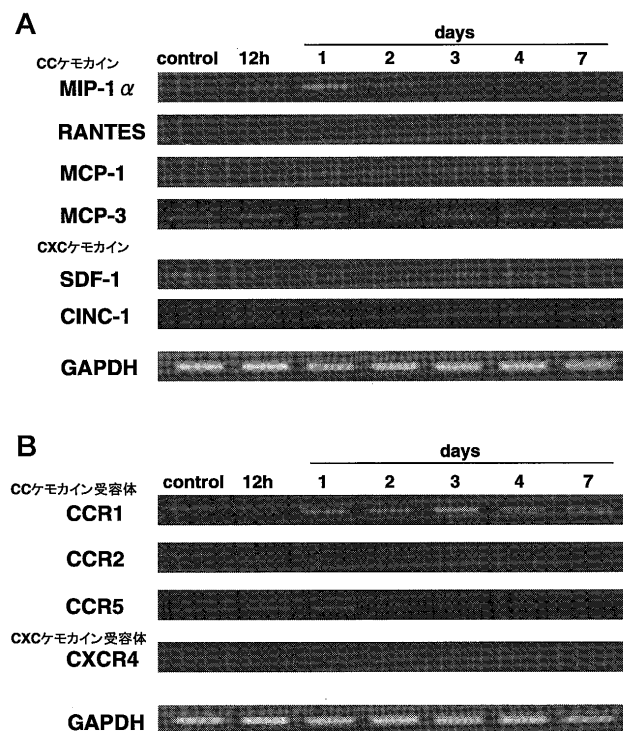


図 3 実験的歯の移動時におけるケモカインならびにケモカイン受容体 mRNA の発現変化
実験的歯の移動を行ったラット上顎骨より抽出した mRNA を用いて、各種ケモカイン（A）ならびにケモカイン受容体（B）の発現を RT-PCR 法にて検索した。
歯の移動に伴い、MIP-1 α , MCP-3, SDF-1, CCR1, CCR5, CXCR4 の mRNA の発現に著明な変化が認められた。

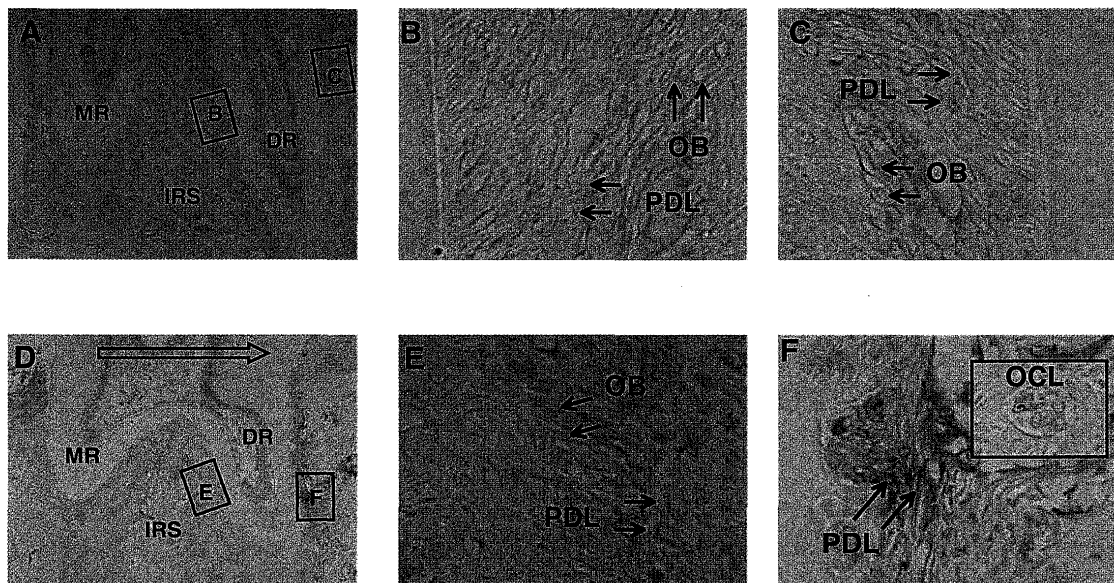


図4 実験的歯の移動時の歯周組織における MIP-1 α の発現様相

歯の移動を行っていない対照群の弱拡大像 (A ; 40倍), 牽引側強拡大像 (B ; 400倍), 圧迫側強拡大像 (C ; 400倍), 移動開始1日後の弱拡大像 (D ; 40倍), 牽引側強拡大像 (E ; 400倍), 圧迫側強拡大像 (F ; 400倍) を示す。

MIP-1 α は移動開始1日後に圧迫側の歯根膜の一部に発現が認められた。

MR : 上顎第二臼歯近心根, DR : 上顎第二臼歯遠心根, IRS : 上顎第二臼歯根間中隔, PDL : 歯根膜線維芽細胞, OB : 骨芽細胞, OCL : 破骨細胞, 白抜き矢印 : 歯の移動方向

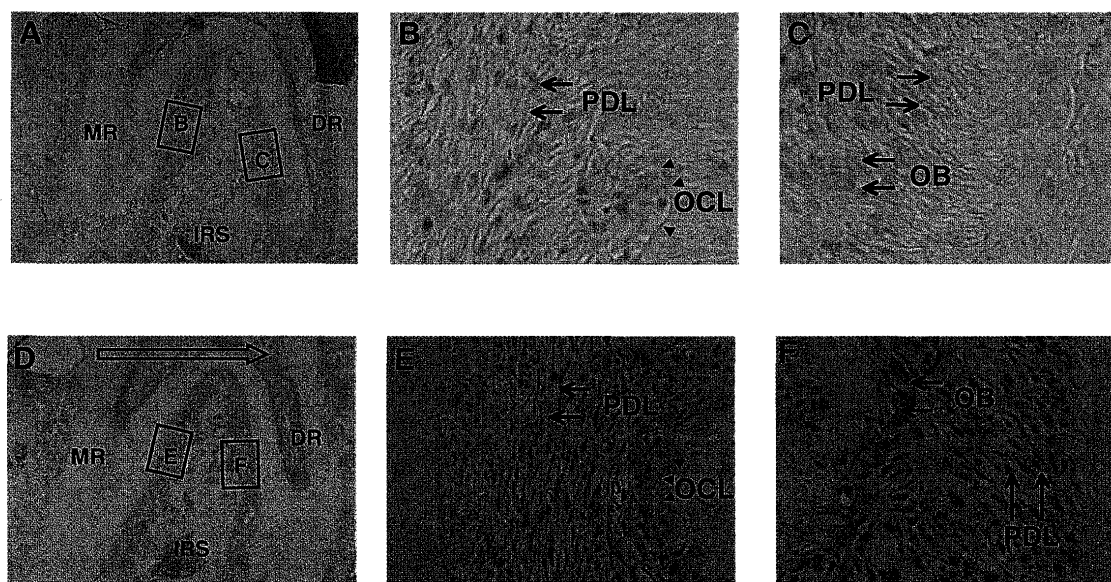


図5 実験的歯の移動時の歯周組織における CCR5 の発現様相

歯の移動を行っていない対照群の弱拡大像 (A ; 40倍), 圧迫側強拡大像 (B ; 400倍), 牽引側強拡大像 (C ; 400倍), 移動開始3日後の弱拡大像 (D ; 40倍), 圧迫側強拡大像 (E ; 400倍), 牽引側強拡大像 (F ; 400倍) を示す。

CCR5 は歯の移動とともに発現が上昇し, 歯根膜線維芽細胞や骨芽細胞にその局在を認めた。移動開始3日後に最も強くなり, 牽引側において圧迫側より強い発現が認められた。

MR : 上顎第二臼歯近心根, DR : 上顎第二臼歯遠心根, IRS : 上顎第二臼歯根間中隔, PDL : 歯根膜線維芽細胞, OB : 骨芽細胞, OCL : 破骨細胞, 白抜き矢印 : 歯の移動方向

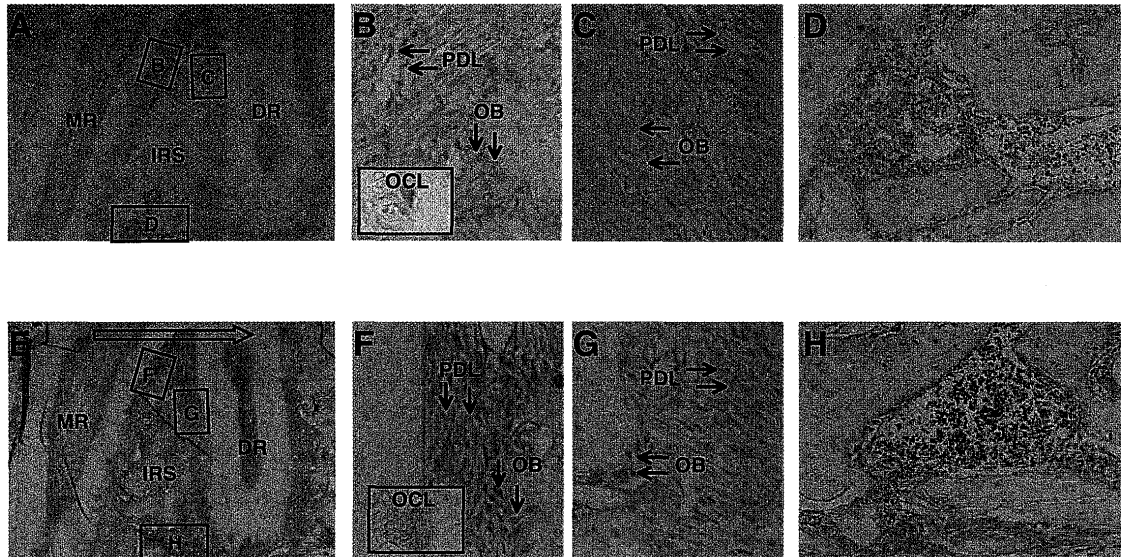


図6 実験的歯の移動時の歯周組織における SDF-1 の発現様相

歯の移動を行っていない対照群の弱拡大像（A；40倍），圧迫側強拡大像（B；400倍），牽引側強拡大像（C；400倍），根間中隔部歯槽骨骨髓腔拡大像（D；200倍），移動開始3日後の弱拡大像（E；40倍），圧迫側強拡大像（F；400倍），牽引側強拡大像（G；400倍），根間中隔部歯槽骨骨髓腔拡大像（H；200倍）を示す。

SDF-1 はコントロールにおいて，圧迫側の歯根膜線維芽細胞，骨芽細胞，破骨細胞に発現が認められたが，牽引側では認められなかった。歯の移動により牽引側でも発現が上昇し，移動開始3日後に発現は最も高くなった。

MR：上顎第二臼歯近心根，DR：上顎第二臼歯遠心根，IRS：上顎第二臼歯根間中隔，PDL：歯根膜線維芽細胞，OB：骨芽細胞，OCL：破骨細胞，白抜き矢印：歯の移動方向

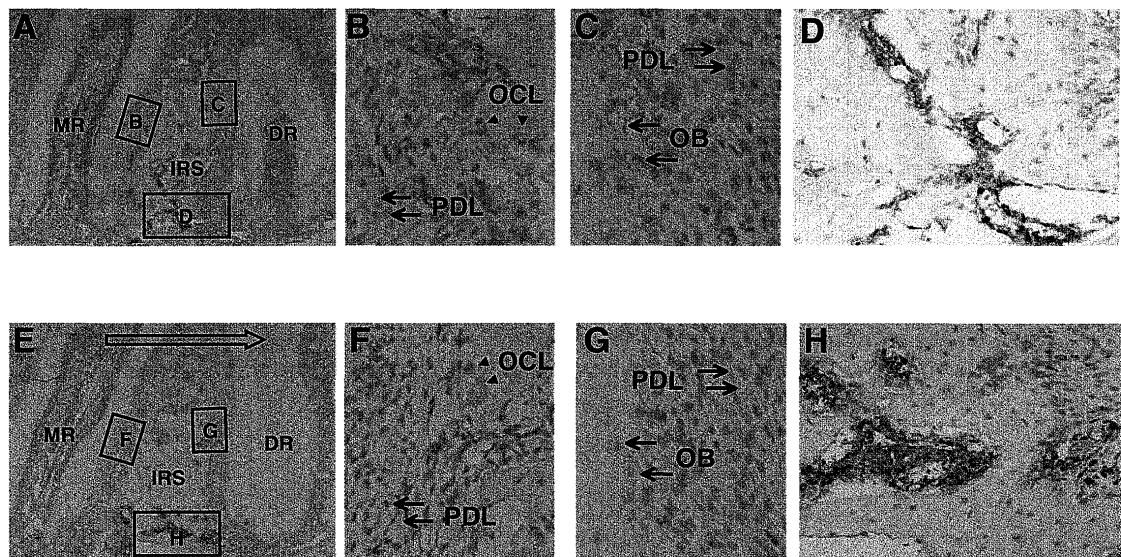


図7 実験的歯の移動時の歯周組織における CXCR4 の発現様相

歯の移動を行っていない対照群の弱拡大像（A；40倍），圧迫側強拡大像（B；400倍），牽引側強拡大像（C；400倍），根間中隔部歯槽骨骨髓腔拡大像（D；200倍），移動開始3日後の弱拡大像（E；40倍），圧迫側強拡大像（F；400倍），牽引側強拡大像（G；400倍），根間中隔部歯槽骨骨髓腔拡大像（H；200倍）を示す。

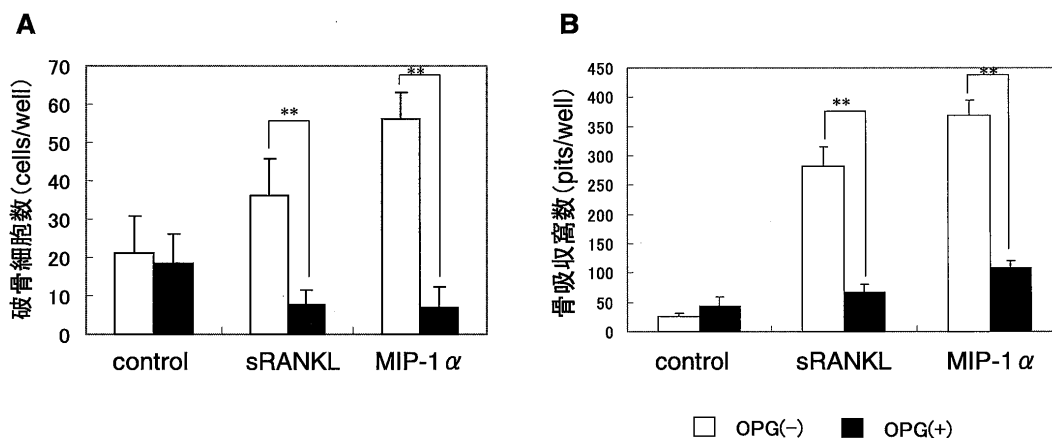
歯根膜線維芽細胞，骨芽細胞，破骨細胞に CXCR4 の発現は認められなかったが，根間中隔部骨髓腔内に陽性細胞が認められ，その数は歯の移動に伴い増加傾向を示した。

MR：上顎第二臼歯近心根，DR：上顎第二臼歯遠心根，IRS：上顎第二臼歯根間中隔，PDL：歯根膜線維芽細胞，OB：骨芽細胞，OCL：破骨細胞，白抜き矢印：歯の移動方向

表2 免疫組織学的手法を用いたケモカインならびに受容体の発現局在

		control		day1		day3		day7	
		PS	TS	PS	TS	PS	TS	PS	TS
MIP-1 α	歯根膜細胞	—	—	++	—	—	—	—	—
	骨芽細胞	—	—	—	—	—	—	—	—
	破骨細胞	—	—	—	—	—	—	—	—
CCR5	歯根膜細胞	—	—	+	+	++	++	+	+
	骨芽細胞	—	—	+	+	—	++	—	+
	破骨細胞	—	—	—	—	—	—	—	—
SDF-1	歯根膜細胞	+	—	+	+	++	+	—	+
	骨芽細胞	+	—	+	+	++	+	+	+
	破骨細胞	+	—	+	—	+	+	+	+
CXCR4	歯根膜細胞	—	—	—	—	—	—	—	—
	骨芽細胞	—	—	—	—	—	—	—	—
	破骨細胞	—	—	—	—	—	—	—	—
	骨髓細胞		+		+		++		+

—: 陰性, +: 陽性(弱), ++: 陽性(中), +++: 陽性(強)
PS: 圧迫側, TS: 牽引側

図8 MIP-1 α が破骨細胞形成・機能に及ぼす影響

ウサギ骨髓細胞を用いて MIP-1 α が破骨細胞形成や骨吸収に及ぼす影響を調べた。MIP-1 α の作用により、破骨細胞数や骨吸収窩数は増加し、MIP-1 α が破骨細胞形成ならびに骨吸収能を促進させることがわかった。またその効果は、osteoprotegerin (OPG) の作用によりコントロールに近いレベルまで減少した。

(** : $P < 0.01$, student's t-test $n = 3$)

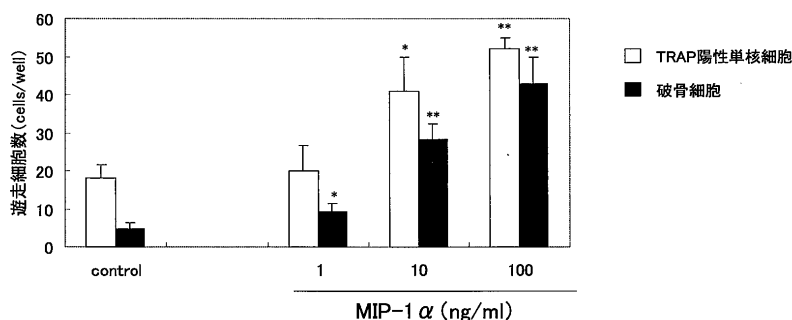


図9 MIP-1 α が破骨細胞遊走に及ぼす影響
ウサギ骨髓細胞を用いて MIP-1 α が破骨細胞の遊走に及ぼす影響を調べた。MIP-1 α は TRAP 陽性単核細胞や破骨細胞に対して濃度依存的に遊走活性を示した。(* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, student's t-test $n = 3$)

ルまで減少した (図8)。また同様にウサギ培養細胞を用いて MIP-1 α の破骨細胞に対する遊走活性について検討した。その結果, MIP-1 α は TRAP 陽性単核細胞や破骨細胞に対して濃度依存的に遊走活性を示した (図9)。

考 察

1. 歯の移動方法について

今回, 実験的歯の移動方法として Waldo 法を用いた。Waldo 法²²⁾ は1954年に報告された, ラットの第一臼歯, 第二臼歯間にエラストックを挿入することにより実験的に歯を移動させる方法で, 簡便であり, 比較的短期間で明瞭な組織変化がみられることから長年にわたり用いられている。今回の実験においても, 7日間の歯の移動で, 一連の歯周組織の変化が観察できたことから歯周組織リモデリングへのケモカインの関与を検討するには有効な方法であったと考えられる。しかし Waldo 法においてエラストック挿入直後に歯にかかる初期荷重は200gに達するとされ²⁴⁾, しかもその力は急速に減衰することから²⁵⁾, 矯正歯科臨床で実際に行われる歯の移動とかけ離れていることが指摘されている。近年, 超弾性, 形状記憶といった力学的特性を有するニッケルチタン系のワイヤーやコイルスプリングが臨床の場において多用されるに伴い, 実験的な歯の移動モデルにおいても弱い矯正力^{26, 27)}, 持続的な矯正力²⁸⁾を用いた実験系が多数報告されるようになってきた。過去に Schwarz²⁹⁾ や Oppenheim³⁰⁾ は毛細血管圧である20~26 g/cm²が, 近藤³¹⁾ は80 g/cm²以下の力が歯の移動速度が最大で, かつ組織への為害作用が少ない至適矯正力であるとして報告している。歯根表面積から算出した, ラット臼歯の至適矯正力は10g以下²⁷⁾とされている。今後, 弱い矯正力あるいは持続的な矯正力を用いた実験系を追加することにより, 歯周組織の反応やケモカインならびにケモカイン受容体の発現様相の差異を検討する必要があると考えられる。

2. 歯周組織リモデリングにおけるケモカインの役割

本研究では, 最初に RT-PCR 法を用いて, 実験的歯の移動に伴うケモカインならびにケモカイン受容体の発現を検索した。その結果, MIP-1 α , MCP-3, SDF-1, CCR1, CCR5, CXCR4の発現に著明な変化を認めた。その中から MIP-1 α とその受容体である CCR1と CCR5, ならびに SDF-1 とその受容体 CXCR4に着目し, それらの発現局在について詳細な検討を行った。

1) MIP-1 α とその受容体

MIP-1 α は CC ケモカインの一つで CCR1 と CCR5 を受容体として結合し, マクロファージ³²⁾, 骨芽細胞³³⁾, 線維芽細胞³⁴⁾, グリア細胞³⁵⁾ など様々な細胞から産生されることが知られている。MIP-1 α のプロモーター領域には AP-1 結合部位の存在が報告されており³⁶⁾, 低酸素³⁵⁾ や LPS 刺激³⁷⁾ をはじめとする種々の刺激が

MIP-1 α 遺伝子の転写活性化に関与していると考えられる。MIP-1 α は単球, T細胞, 未熟樹状細胞に対して遊走活性を示すだけでなく, 破骨細胞の機能にも影響を与えることが知られていて, ヒト骨髄細胞³³⁾, ラット骨髄細胞³⁸⁾ を用いた *in vitro* の実験で, MIP-1 α が破骨細胞の分化誘導を促進することが報告されている。またラット骨髄細胞を用いた実験で MIP-1 α が破骨細胞の運動能を高めること³⁹⁾ やヒト培養細胞⁴⁰⁾, マウス骨髄細胞⁴¹⁾ を用いた実験で MIP-1 α が破骨細胞の遊走を促進させることが報告されている。近年, 多発性骨髄腫における骨破壊病変にも MIP-1 α が関与していることが明らかとなった^{42, 43)}。しかし MIP-1 α の破骨細胞への作用機序に関する詳細な報告は少ない。

一方, CCR1 は G タンパク共役 7 回膜貫通型受容体で, 単球, 好中球, T細胞, 未熟樹状細胞などに発現しており, MIP-1 α , RANTES, MCP-3 がリガンドとして結合する⁴⁴⁾。CCR1 ノックアウトマウスの解析では腎移植における拒絶反応の抑制, 脾炎に伴う肺障害の抑制, 骨髄球系前駆細胞数の減少などが報告されており⁴⁵⁾, CCR1 は炎症反応, 生体防御, 造血に深く関わっていると考えられる。最近ではマウス骨髄細胞由来の破骨細胞を RANKL で刺激すると CCR1 mRNA の発現が上昇する⁴⁶⁾ ことや, マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 から RANKL 刺激により分化した TRAP 陽性多核細胞が CCR1 を発現している⁴¹⁾ ことなど, 破骨細胞との関連を示唆する報告もみられる。CCR5 も G タンパク共役 7 回膜貫通型受容体で, T細胞⁴⁷⁾, 単球⁴⁸⁾, マクロファージ⁴⁹⁾, 樹状細胞⁸⁾ などに発現しており, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES がリガンドとして結合する。ヒト免疫不全ウイルス (以下 HIV と略す) が宿主細胞である T細胞やマクロファージに感染するときに CCR5 が共受容体として働くことから, CCR5 は HIV 感染に必須の分子として広く知られるようになった⁵⁰⁾。破骨細胞の分化に必須の因子として receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) が知られている⁵¹⁾。RANKL は TNF ファミリーに属し, 細胞膜貫通領域を持つタンパクである。骨芽細胞, 骨髄ストローマ細胞をはじめ T細胞⁴⁷⁾, 滑膜細胞⁵²⁾ に発現していることが知られている。骨芽細胞あるいはストローマ細胞における RANKL の発現を誘導する因子としては活性型ビタミン D₃, 副甲状腺ホルモン (PTH), インターロイキン11 (IL-11) などが既に知られている⁵³⁾。近年, マウスのストローマ細胞株である ST-2 細胞に CCR5 が発現しており, ビタミン D₃ 存在下で MIP-1 α を作用させると, 濃度依存的に RANKL の発現が高まることが報告された⁴²⁾。また骨芽細胞, ストローマ細胞における RANKL の発現促進は細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇に依存している⁵⁴⁾ ことや, CCR5 発現細胞にリガンドである RANTES や MIP-1 β を作用させると, 細胞内 Ca²⁺ 濃度が上昇することも報告されている^{55, 56)}。このことから MIP-1 α は CCR5 を介して骨芽細胞を活性化し, RANKL

の発現上昇をはじめとする細胞機能に影響を与えている可能性が考えられる。

本研究では歯の移動を行っていないコントロールにおいて MIP-1 α , CCR5 とともに発現が認められなかったが、歯の移動とともにこれらの発現は上昇し、MIP-1 α は圧迫側の歯根膜線維芽細胞において、CCR5 は圧迫側および牽引側の歯根膜線維芽細胞や骨芽細胞において発現が認められた。ウサギ培養細胞を用いた *in vitro* の実験では、MIP-1 α は濃度依存的に破骨細胞形成・機能促進作用を示し、その作用は RANK-RANKL 結合を競合的に阻害する分泌タンパクである osteoprotegerin⁵⁷⁾ の添加によりコントロールとほぼ同じレベルまで減少した。また MIP-1 α は TRAP 陽性単核細胞や破骨細胞の遊走を濃度依存的に促進させた。このことから歯の移動に伴う刺激により発現が誘導された MIP-1 α が、CCR5 を発現している骨芽細胞を活性化し、RANK-RANKL のシグナリングを介して破骨細胞の分化誘導を促進し歯槽骨リモデリング、特に骨吸収に深く関与している可能性が考えられた。本研究では、歯根膜線維芽細胞も CCR5 を発現していることが明らかとなった。歯根膜線維芽細胞が RANKL を発現することについては、既に *in vivo*⁵⁸⁾, *in vitro*⁵⁹⁾ の実験報告がある。CCR5 が RANKL の発現をはじめとする歯根膜線維芽細胞の機能にどのような影響を与えるのか、今後検討が必要である。一方、破骨細胞に分化すると考えられている単球には CCR5 が発現していることが報告されている⁶⁰⁾ が、本研究においては破骨細胞に CCR5 の発現は確認できなかった。この原因として破骨細胞への分化段階で受容体の発現が減少した可能性が考えられる。また、CCR1 は PCR にて発現が確認されたが、免疫染色では陽性染色を認めなかった。この原因として、発現したタンパク量が免疫染色で検出可能なレベルを下回っていたか、あるいは使用した抗体が発現しているタンパクを十分に認識できなかった可能性が考えられる。今後、組織処理の方法や抗原性賦活化処理をはじめとする染色条件に関して、より詳細に検討する一方、ウエスタン・ブロッティングや *in situ* hybridization 法など他の手法を用いた検索も併せて行う必要があると考えられる。

2) SDF-1 とその受容体 CXCR4

SDF-1 は CXC ケモカインの一つで CXCR4 が唯一の受容体であり⁶¹⁻⁶³⁾、心臓、肝臓、腎臓、脾臓など多くの臓器において発現が確認されている⁶⁴⁾。ノックアウトマウスの解析から SDF-1 は炎症時における白血球の遊走だけでなく、胎生期の造血⁶³⁾、心室中隔の形成⁶²⁾、神経組織の形成⁶¹⁾、消化管の血管形成⁶²⁾ など様々な生命現象に関与していることが明らかにされている。多くのケモカインが炎症等の刺激により発現誘導されるのに対して SDF-1 は恒常的に発現している⁶⁴⁾。SDF-1 のプロモーター領域には他の CXC ケモカインのプロモーター領域

に存在する AP-1 や NF- κ B の結合部位⁶⁵⁾ が存在せず、ハウスキーピング遺伝子のような特異的発現を示さない遺伝子群に顕著に見られる CpG 島と呼ばれるシチジン、グアノシンに富む配列が認められることが報告されており⁶⁴⁾、それが恒常的な発現に関与しているのではないかと考えられている。一方で低酸素刺激により SDF-1 の産生が誘導され、その誘導に低酸素応答性の転写調節因子である HIF-1 が関与しているという報告もある^{66, 67)}。

受容体である CXCR4 は造血幹細胞、T細胞、B細胞、樹状細胞に発現しており、CCR5 とともに HIV 感染に必須の分子としても広く知られている⁶⁸⁾。また CXCR4 の発現は乳がん細胞¹²⁾ や口腔扁平上皮癌細胞¹¹⁾ において上昇しており、遠隔臓器への転移に関与することが知られている。Yu ら⁶⁹⁾ は、循環している CXCR4 陽性破骨細胞前駆細胞が骨髄ストローマ細胞から産生される SDF-1 により骨髄中に誘導され、そこでストローマ細胞の発現する RANKL の作用を受け破骨細胞へと分化し骨吸収に関与する可能性を示した。また血管内皮前駆細胞が CXCR4 を発現しているという報告もある^{66, 70)}。

本研究においても SDF-1 は歯の移動を行っていないコントロールで発現が認められたことから、歯周組織においても SDF-1 は恒常的に発現していることがわかった。また歯の移動開始直後に、一過性に SDF-1 の発現減少が認められた。ヒト歯肉由来の線維芽細胞に IL-1 α や TNF- α といった炎症性サイトカインを作用させると、SDF-1 の発現が減少することや創傷治癒過程において SDF-1 の発現が減少することが報告されている⁷¹⁾。歯の移動時には歯周組織局所において、炎症性サイトカインの産生が上昇することが既に知られており^{3, 72, 73)}、歯根膜線維芽細胞や骨芽細胞に直接加わった刺激、あるいは歯周組織局所で産生された炎症性サイトカインが SDF-1 の発現に影響を及ぼした可能性が考えられる。今回の実験では歯槽骨骨髄中に CXCR4 陽性細胞が多数認められ、歯の移動にともない陽性細胞は増加した。また骨髄腔周囲の骨芽細胞の SDF-1 発現も歯の移動とともに上昇していた。このことから歯の移動時においても SDF-1/CXCR4 系のケモカインシグナルにより破骨細胞前駆細胞や血管内皮前駆細胞の歯周組織局所へ移動が起こり、歯周組織リモデリングに深く関わっている可能性が考えられる。歯の移動時には圧迫側の歯周組織において一時的に虚血が生じることが知られている。しかし歯の移動と低酸素応答性因子の発現との関連を調べた報告はほとんど無く、歯周組織局所における虚血や低酸素状態が SDF-1 をはじめとする各種因子の発現に及ぼす影響を詳細に検討する余地があると考えられる。また歯槽骨内で認められた CXCR4 陽性細胞がどのような性質の細胞なのかを同定するためには、造血幹細胞マーカーである CD34、血管内皮細胞マーカーである CD31 など細胞の種類や分化段階に応じた細胞表面マーカーを用いた詳細な検討が今後必要である。

3) その他のケモカインについて

PCRにて発現が確認できたが、今回免疫組織学的検索の対象としなかったケモカインにはMCP-1, MCP-3, CINC-1がある。MCP-1は単球, マクロファージ, 線維芽細胞, 血管内皮細胞から産生され⁷⁴⁾, 単球, T細胞の遊走を引き起こすCCケモカインである。口腔領域では歯の萌出時に歯胚周囲に存在する歯小嚢細胞において発現が上昇することにより単球の遊走を促し, その単球が破骨細胞に分化することにより萌出路の形成に関わるという報告^{20, 21)}があり, 骨リモデリング, 特に骨吸収との関連が示唆されている。またMCP-1がアポトーシスを抑制し細胞保護作用を示すこと⁷⁵⁾や創傷治癒に関わっていること⁷⁶⁾が報告されており, 機械的あるいは低酸素素といった様々なストレスの加わる歯周組織局所において細胞の恒常性維持に関与している可能性がある。MCP-3もMCP-1と同様に単球, マクロファージ^{44, 77)}, 線維芽細胞⁷⁸⁾から産生され, 単球, T細胞^{44, 77)}, 好酸球⁷⁹⁾に対して遊走活性を示すことが知られている。最近では強皮症における皮膚硬化機序への関与⁸⁰⁾, 抗腫瘍活性⁸¹⁾が注目されている。Takemuraらは, ヒト子宮頸部由来の線維芽細胞に周期的伸展刺激を加えるとMCP-3の発現が上昇することを明らかにした⁸²⁾。またMCP-3が破骨細胞の遊走を促進させるという報告⁸³⁾もあることから, 歯の移動時に産生されたMCP-3が破骨細胞の遊走に関与している可能性が示唆される。CINC-1はヒトIL-8に相当するラットCXCケモカインの一つであり, CXCR2を受容体として結合する。CINC-1の代表的な生物活性は好中球に対する遊走活性である⁸⁴⁾。ヒトIL-8には血管新生作用⁹⁾や破骨細胞形成促進作用⁸⁵⁾があることが知られているが, CINC-1もラットの角膜を用いた実験で血管新生作用を示すことが報告されている⁸⁶⁾。以上のように免疫組織学的検索の対象としなかったケモカインにも歯周組織リモデリングに関連する報告があり, 今後詳細な発現検討をする余地があると考えられる。

結 論

1. MIP-1 α およびCCR5の発現パターンとウサギ培養細胞を用いた*in vitro*における実験結果から, 圧迫側ではMIP-1 α がCCR5を介して骨芽細胞を活性化することで破骨細胞の分化誘導を促進し, 歯周組織, 特に骨リモデリングに関与している可能性が考えられる。またSDF-1およびCXCR4の発現パターンから, SDF-1は歯槽骨の骨髄中に存在する破骨細胞前駆細胞や血管内皮前駆細胞などの造血系細胞を歯周組織局所に遊走させ歯周組織リモデリングに関与している可能性が考えられる。
2. 牽引側では圧迫側と同様にSDF-1やCCR5の発現が歯根膜線維芽細胞や骨芽細胞にて観察された。それらの役割や作用機序に関しては不明な点が多い

が, 発現上昇が牽引側の骨形成, 歯根膜や血管の新生といった歯周組織リモデリング過程に関与している可能性が考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 終始御指導, 御高閲を賜りました口腔顎顔面矯正学分野 森山啓司教授に深甚なる謝意を表しますとともに, 御高閲, 御助言を賜りました口腔組織学分野 羽地達次教授, 歯科保存学分野 松尾敬志教授に深謝致します。本研究の実施に際して直接御指導, 御助言を頂きました口腔顎顔面矯正学分野 大庭康雄助教授に厚く御礼申し上げます。また御支援, 御協力を頂いた日浦賢治博士, 生体情報内科学分野 安倍正博講師に厚く御礼申し上げます。最後に, 本研究に際して御支援, 御協力を頂きました口腔顎顔面矯正学分野の先生方に深く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Guajardo G, Okamoto Y, Gogen H, Shanfeld JL, Dobeck J, Herring AH and Davidovitch Z: Immunohistochemical localization of epidermal growth factor in cat paradental tissues during tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 118, 210-219 (2000)
- 2) Saito I, Hanada K and Maeda T: Alteration of nerve growth factor-receptor expression in the periodontal ligament of the rat during experimental tooth movement. *Arch Oral Biol* 38, 923-929 (1993)
- 3) Alhashimi N, Frithiof L, Brudvik P and Bakhtiet M: Orthodontic tooth movement and de novo synthesis of proinflammatory cytokines. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 119, 307-312 (2001)
- 4) Kvinnsland I and Kvinnsland S: Changes in CGRP-immunoreactive nerve fibres during experimental tooth movement in rats. *Eur J Orthod* 12, 320-329 (1990)
- 5) Terai K, Takano-Yamamoto T, Ohba Y, Hiura K, Sugimoto M, Sato M, Kawahata H, Inaguma N, Kitamura Y and Nomura S: Role of osteopontin in bone remodeling caused by mechanical stress. *J Bone Miner Res* 14, 839-849 (1999)
- 6) Takahashi I, Nishimura M, Onodera K, Bae JW, Mitani H, Okazaki M, Sasano Y and Mitani H: Expression of MMP-8 and MMP-13 genes in the periodontal ligament during tooth movement in rats. *J Dent Res* 82, 646-651 (2003)
- 7) Ohba Y, Ohba T, Terai K and Moriyama K: Expression of cathepsin K mRNA during experimental tooth movement in rat as revealed by *in situ* hybridization. *Arch Oral Biol* 45, 63-69 (2000)
- 8) Sozzani S, Allavena P, Vecchi A and Mantovani A: The role of chemokines in the regulation of dendritic cell

- trafficking. *J Leukoc Biol* 66, 1-9 (1999)
- 9) Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ and Singh RK: IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol* 170, 3369-3376 (2003)
 - 10) Bernardini G, Ribatti D, Spinetti G, Morbidelli L, Ziche M, Santoni A, Capogrossi MC and Napolitano M: Analysis of the role of chemokines in angiogenesis. *J Immunol Methods* 273, 83-101 (2003)
 - 11) Uchida D, Begum NM, Almofti A, Nakashiro K, Kawamata H, Tateishi Y, Hamakawa H, Yoshida H and Sato M: Possible role of stromal-cell-derived factor-1/CXCR4 signaling on lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma. *Exp Cell Res* 290, 289-302 (2003)
 - 12) Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verastegui E and Zlotnik A: Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410, 50-56 (2001)
 - 13) 高橋加奈子: 歯髄炎の病態形成における CCL20の役割. *四国歯誌* 17, 193-210 (2004)
 - 14) Huang GT, Potente AP, Kim JW, Chugal N and Zhang X: Increased interleukin-8 expression in inflamed human dental pulps. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 88, 214-220 (1999)
 - 15) Garlet GP, Martins W, Jr., Ferreira BR, Milanezi CM and Silva JS: Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. *J Periodontal Res* 38, 210-217 (2003)
 - 16) Hosokawa Y, Nakanishi T, Yamaguchi D, Takahashi K, Yumoto H, Ozaki K and Matsuo T: Macrophage inflammatory protein 3 α -CC chemokine receptor 6 interactions play an important role in CD4+ T-cell accumulation in periodontal diseased tissue. *Clin Exp Immunol* 128, 548-554 (2002)
 - 17) Kabashima H, Yoneda M, Nagata K, Hirofuji T, Ishihara Y, Yamashita M and Maeda K: The presence of chemokine receptor (CCR5, CXCR3, CCR3)-positive cells and chemokine (MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , IP-10)-positive cells in human periapical granulomas. *Cytokine* 16, 62-66 (2001)
 - 18) Gemmell E, Carter CL and Seymour GJ: Chemokines in human periodontal disease tissues. *Clin Exp Immunol* 125, 134-141 (2001)
 - 19) Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O and Silva A: Characterization of cellular infiltrate, detection of chemokine receptor CCR5 and interleukin-8 and RANTES chemokines in adult periodontitis. *J Periodontal Res* 36, 194-203 (2001)
 - 20) Bsoul S, Terezhalmay G, Abboud H, Woodruff K and Abboud SL: PDGF BB and bFGF stimulate DNA synthesis and upregulate CSF-1 and MCP-1 gene expression in dental follicle cells. *Arch Oral Biol* 48, 459-465 (2003)
 - 21) Wise GE, Que BG and Huang H: Synthesis and secretion of MCP-1 by dental follicle cells-implications for tooth eruption. *J Dent Res* 78, 1677-1681 (1999)
 - 22) Waldo CM and Rothblatt JM: Histologic response to tooth movement in the laboratory rat; procedure and preliminary observations. *J Dent Res* 33, 481-486 (1954)
 - 23) Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, Tanaka H, Sasaki T, Nishihara T, Koga T, Martin TJ and Suda T: Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 7260-7264 (1990)
 - 24) Azuma M: Study on histologic changes of periodontal membrane incident to experimental tooth movement. *Bull Tokyo Med Dent Univ* 17, 149-178 (1970)
 - 25) Hatai T, Yokozeki M, Funato N, Baba Y, Moriyama K, Ichijo H and Kuroda T: Apoptosis of periodontal ligament cells induced by mechanical stress during tooth movement. *Oral Dis* 7, 287-290 (2001)
 - 26) Nakanishi H, Seki Y, Kohno T, Muramoto T, Toda K and Soma K: Changes in response properties of periodontal mechanoreceptors after experimental orthodontic tooth movement in rats. *Angle Orthod* 74, 93-99 (2004)
 - 27) Kohno T, Matsumoto Y, Kanno Z, Warita H and Soma K: Experimental tooth movement under light orthodontic forces: rates of tooth movement and changes of the periodontium. *J Orthod* 29, 129-135 (2002)
 - 28) Von Bohl M, Maltha J, Von den Hoff H and Kuijpers-Jagtman AM: Changes in the periodontal ligament after experimental tooth movement using high and low continuous forces in beagle dogs. *Angle Orthod* 74, 16-25 (2004)
 - 29) Schwarz AM: Über die Behebung belasteter Zahn. *Z Stomatol* 26, 4-21 (1928)
 - 30) Oppenheim AA: possibility for physiologic orthodontic movement. *Am J Orthod Oral Surg* 30, 277-332 (1944)
 - 31) 近藤勝義: インピーダンス・プレステモグラフィによる歯根膜循環動態の研究. *口病誌* 36, 20-42 (1969)
 - 32) Shi MM, Godleski JJ and Paulauskis JD: Molecular cloning and posttranscriptional regulation of macrophage inflammatory protein-1 α in alveolar macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 211, 289-295 (1995)
 - 33) Kukita T, Nomiyama H, Ohmoto Y, Kukita A, Shuto

- T, Hotokebuchi T, Sugioka Y, Miura R and Iijima T: Macrophage inflammatory protein-1 α (LD78) expressed in human bone marrow: Its role in regulation of hematopoiesis and osteoclast recruitment. *Lab Invest* 76, 399-406 (1997)
- 34) Brouty-Boye D, Pottin-Clemenceau C, Doucet C, Jasmin C and Azzarone B: Chemokines and CD40 expression in human fibroblasts. *Eur J Immunol* 30, 914-919 (2000)
- 35) Cowell RM, Xu H, Galasso JM and Silverstein FS: Hypoxic-ischemic injury induces macrophage inflammatory protein-1 α expression in immature rat brain. *Stroke* 33, 795-801 (2002)
- 36) Choi SJ, Oba T, Callander NS, Jelinek DF and Roodman GD: AML-1A and AML-1B regulation of MIP-1 α expression in multiple myeloma. *Blood* 101, 3778-3783 (2003)
- 37) Shanley TP, Schmal H, Friedl HP, Jones ML and Ward PA: Role of macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) in acute lung injury in rats. *J Immunol* 154, 4793-4802 (1995)
- 38) Kukita T, Nakao J, Hamada F, Kukita A, Inai T, Kurisu K and Nomiyama H: Recombinant LD78 protein, a member of the small cytokine family, enhances osteoclast differentiation in rat bone marrow culture system. *Bone Miner* 19, 215-223 (1992)
- 39) Fuller K, Owens JM and Chambers TJ: Macrophage inflammatory protein-1 α and IL-8 stimulate the motility but suppress the resorption of isolated rat osteoclasts. *J Immunol* 154, 6065-6072 (1995)
- 40) Votta BJ, White JR, Dodds RA, James IE, Connor JR, Lee-Rykaczewski E, Eichman CF, Kumar S, Lark MW and Gowen M: CK β -8 [CCL23], a novel CC chemokine, Is chemotactic for human osteoclast precursors and is expressed in bone tissues. *J Cell Physiol* 183, 196-207 (2000)
- 41) Yu X, Huang Y, Collin-Osdoby P and Osdoby P: CCR1 chemokines promote the chemotactic recruitment, RANKL development, and motility of osteoclasts and are induced by inflammatory cytokines in osteoblasts. *J Bone Miner Res* 19, 2065-2077 (2004)
- 42) Abe M, Hiura K, Wilde J, Moriyama K, Hashimoto T, Ozaki S, Wakatsuki S, Kosaka M, Kido S, Inoue D and Matsumoto T: Role for macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α and MIP-1 β in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *Blood* 100, 2195-2202 (2002)
- 43) Han JH, Choi SJ, Kurihara N, Koide M, Oba Y and Roodman GD: Macrophage inflammatory protein-1 α is an osteoclastogenic factor in myeloma that is independent of receptor activator of nuclear factor κ B ligand. *Blood* 97, 3349-3353 (2001)
- 44) Rollins BJ: Chemokines. *Blood* 90, 909-928 (1997)
- 45) Gao JL, Wynn TA, Chang Y, Lee EJ, Broxmeyer HE, Cooper S, Tiffany HL, Westphal H, Kwon-Chung J and Murphy PM: Impaired host defense, hematopoiesis, granulomatous inflammation and type 1-type 2 cytokine balance in mice lacking CC chemokine receptor 1. *J Exp Med* 185, 1959-1968 (1997)
- 46) Lean JM, Murphy C, Fuller K and Chambers TJ: CCL9/MIP-1 γ and its receptor CCR1 are the major chemokine ligand/receptor species expressed by osteoclasts. *J Cell Biochem* 87, 386-393 (2002)
- 47) Taubman MA and Kawai T: Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption. *Crit Rev Oral Biol Med* 12, 125-135 (2001)
- 48) Combadiere C, Ahuja SK, Tiffany HL and Murphy PM: Cloning and functional expression of CC CCR5, a human monocyte CC chemokine receptor selective for MIP-1 α , MIP-1 β , and RANTES. *J Leukoc Biol* 60, 147-152 (1996)
- 49) Wu L, Paxton WA, Kassam N, Ruffing N, Rottman JB, Sullivan N, Choe H, Sodroski J, Newman W, Koup RA and Mackay CR: CCR5 levels and expression pattern correlate with infectability by macrophage-tropic HIV-1, in vitro. *J Exp Med* 185, 1681-1691 (1997)
- 50) Doms RW and Peiper SC: Unwelcomed guests with master keys: how HIV uses chemokine receptors for cellular entry. *Virology* 235, 179-190 (1997)
- 51) Nakagawa N, Kinoshita M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Yano K, Morinaga T and Higashio K: RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 253, 395-400 (1998)
- 52) Gravallese EM, Manning C, Tsay A, Naito A, Pan C, Amento E and Goldring SR: Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. *Arthritis Rheum* 43, 250-258 (2000)
- 53) Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT and Martin TJ: Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 20, 345-357 (1999)
- 54) Takami M, Takahashi N, Udagawa N, Miyaura C, Suda K, Woo JT, Martin TJ, Nagai K and Suda T: Intracellular calcium and protein kinase C mediate expression of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin in osteoblasts. *Endocrinology* 141, 4711-4719 (2000)
- 55) Schwabe RF, Bataller R and Brenner DA: Human hepatic

- stellate cells express CCR5 and RANTES to induce proliferation and migration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285, G949-958 (2003)
- 56) Schechter AD, Calderon TM, Berman AB, McManus CM, Fallon JT, Rossikhina M, Zhao W, Christ G, Berman JW and Taubman MB: Human vascular smooth muscle cells possess functional CCR5. *J Biol Chem* 275, 5466-5471 (2000)
 - 57) Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, Yano K, Fujise N, Sato Y, Goto M, Yamaguchi K, Kuriyama M, Kanno T, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T and Higashio K: Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 139, 1329-1337 (1998)
 - 58) Ogasawara T, Yoshimine Y, Kiyoshima T, Kobayashi I, Matsuo K, Akamine A and Sakai H: In situ expression of RANKL, RANK, osteoprotegerin and cytokines in osteoclasts of rat periodontal tissue. *J Periodontal Res* 39, 42-49 (2004)
 - 59) Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y and Mitani H: Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by receptor activator of nuclear factor κ B ligand up-regulation via prostaglandin E₂ synthesis. *J Bone Miner Res* 17, 210-220 (2002)
 - 60) Fantuzzi L, Borghi P, Ciolli V, Pavlakis G, Belardelli F and Gessani S: Loss of CCR2 expression and functional response to monocyte chemotactic protein (MCP-1) during the differentiation of human monocytes: role of secreted MCP-1 in the regulation of the chemotactic response. *Blood* 94, 875-883 (1999)
 - 61) Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I and Littman DR: Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 393, 595-599 (1998)
 - 62) Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y, Kitamura Y, Matsushima K, Yoshida N, Nishikawa S, Kishimoto T and Nagasawa T: The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 393, 591-594 (1998)
 - 63) Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, Yoshida N, Kikutani H and Kishimoto T: Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 382, 635-638 (1996)
 - 64) Shirozu M, Nakano T, Inazawa J, Tashiro K, Tada H, Shinohara T and Honjo T: Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics* 28, 495-500 (1995)
 - 65) Lakshminarayanan V, Drab-Weiss EA and Roebuck KA: H₂O₂ and tumor necrosis factor- α induce differential binding of the redox-responsive transcription factors AP-1 and NF- κ B to the interleukin-8 promoter in endothelial and epithelial cells. *J Biol Chem* 273, 32670-32678 (1998)
 - 66) Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, Capla JM, Galiano RD, Levine JP and Gurtner GC: Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* 10, 858-864 (2004)
 - 67) Hitchon C, Wong K, Ma G, Reed J, Lyttle D and El-Gabalawy H: Hypoxia-induced production of stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) and vascular endothelial growth factor by synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 46, 2587-2597 (2002)
 - 68) Nagasawa T, Tachibana K and Kawabata K: A CXC chemokine SDF-1/PBSF: a ligand for a HIV coreceptor, CXCR4. *Adv Immunol* 71, 211-228 (1999)
 - 69) Yu X, Huang Y, Collin-Osdoby P and Osdoby P: Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) recruits osteoclast precursors by inducing chemotaxis, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity, and collagen transmigration. *J Bone Miner Res* 18, 1404-1418 (2003)
 - 70) Urbich C and Dimmeler S: Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res* 95, 343-353 (2004)
 - 71) Fedyk ER, Jones D, Critchley HO, Phipps RP, Blieden TM and Springer TA: Expression of stromal-derived factor-1 is decreased by IL-1 and TNF and in dermal wound healing. *J Immunol* 166, 5749-5754 (2001)
 - 72) Uematsu S, Mogi M and Deguchi T: Interleukin (IL)-1 β , IL-6, tumor necrosis factor- α , epidermal growth factor, and β ₂-microglobulin levels are elevated in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *J Dent Res* 75, 562-567 (1996)
 - 73) Lowney JJ, Norton LA, Shafer DM and Rossomando EF: Orthodontic forces increase tumor necrosis factor α in the human gingival sulcus. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 108, 519-524 (1995)
 - 74) Yu X and Graves DT: Fibroblasts, mononuclear phagocytes, and endothelial cells express monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in inflamed human gingiva. *J Periodontol* 66, 80-88 (1995)
 - 75) Eugenini EA, D'Aversa TG, Lopez L, Calderon TM and Berman JW: MCP-1 (CCL2) protects human neurons and astrocytes from NMDA or HIV-tat-induced apoptosis. *J Neurochem* 85, 1299-1311 (2003)
 - 76) Low QE, Drugea IA, Duffner LA, Quinn DG, Cook DN, Rollins BJ, Kovacs EJ and DiPietro LA: Wound healing

- in MIP-1 α (-/-) and MCP-1(-/-) mice. *Am J Pathol* 159, 457-463 (2001)
- 77) Menten P, Wuyts A and Van Damme J: Monocyte chemotactic protein-3. *Eur Cytokine Netw* 12, 554-560 (2001)
- 78) Menten P, Proost P, Struyf S, Van Coillie E, Put W, Lenaerts JP, Conings R, Jaspar JM, De Groote D, Billiau A, Opdenakker G and Van Damme J: Differential induction of monocyte chemotactic protein-3 in mononuclear leukocytes and fibroblasts by interferon- α/β and interferon- γ reveals MCP-3 heterogeneity. *Eur J Immunol* 29, 678-685 (1999)
- 79) Dahinden CA, Geiser T, Brunner T, von Tschärner V, Caput D, Ferrara P, Minty A and Baggiolini M: Monocyte chemotactic protein 3 is a most effective basophil- and eosinophil-activating chemokine. *J Exp Med* 179, 751-756 (1994)
- 80) Ong VH, Evans LA, Shiwen X, Fisher IB, Rajkumar V, Abraham DJ, Black CM and Denton CP: Monocyte chemoattractant protein 3 as a mediator of fibrosis: Overexpression in systemic sclerosis and the type 1 tight-skin mouse. *Arthritis Rheum* 48, 1979-1991 (2003)
- 81) Hu JY, Li GC, Wang WM, Zhu JG, Li YF, Zhou GH and Sun QB: Transfection of colorectal cancer cells with chemokine MCP-3 (monocyte chemotactic protein-3) gene retards tumor growth and inhibits tumor metastasis. *World J Gastroenterol* 8, 1067-1072 (2002)
- 82) Takemura M, Itoh H, Sagawa N, Yura S, Korita D, Kakui K, Hirota N and Fujii S: Cyclic mechanical stretch augments both interleukin-8 and monocyte chemotactic protein-3 production in the cultured human uterine cervical fibroblast cells. *Mol Hum Reprod* 10, 573-580 (2004)
- 83) Choi Y, Woo KM, Ko SH, Lee YJ, Park SJ, Kim HM and Kwon BS: Osteoclastogenesis is enhanced by activated B cells but suppressed by activated CD8(+) T cells. *Eur J Immunol* 31, 2179-2188 (2001)
- 84) Shibata F, Konishi K and Nakagawa H: Identification of a common receptor for three types of rat cytokine-induced neutrophil chemoattractants (CINCs). *Cytokine* 12, 1368-1373 (2000)
- 85) Bendre MS, Montague DC, Peery T, Akel NS, Gaddy D and Suva LJ: Interleukin-8 stimulation of osteoclastogenesis and bone resorption is a mechanism for the increased osteolysis of metastatic bone disease. *Bone* 33, 28-37 (2003)
- 86) Yoshida A, Yoshida S, Hata Y, Khalil AK, Ishibashi T and Inomata H: The role of NF- κ B in retinal neovascularization in the rat. Possible involvement of cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC), a member of the interleukin-8 family. *J Histochem Cytochem* 46, 429-436 (1998)